2 液体クロマトグラフ用製品

Ⅰ. カラム選択ガイド
Ⅰ-1. 試料の特性による選択例 …… 32
Ⅰ-2. 試料別による選択例 …… 33
Ⅰ-3. 特殊用途による選択例 …… 33
Ⅱ. 充てん剤一覧 …… 34
Ⅲ. 品質保証、カラム管理上の注意点 …… 36
Ⅲ-1. カラム品質 …… 36
Ⅲ-2. カラム管理上の注意点 …… 38
Ⅳ. HPLC用カラム Wakopak®
Ⅳ-1. 逆相分配 …… 40
Ⅳ-2. 順相分配 …… 59
Ⅳ-3. 吸着 …… 61
Ⅳ-4. UHPLC用 …… 62
Ⅳ-5. 親水性相互作用(HILIC) …… 64
Ⅳ-6. サイズ排除 …… 66
Ⅳ-7. イオン交換 …… 68
注文方法 …… 69
価格表 …… 70
Ⅴ. 周辺器材 …… 81
Ⅵ. フラッシュクロマトグラフ用カラム Presep®
Ⅵ-1. シリカゲルカラム …… 82
Ⅵ-2. NH_2シリカゲルカラム …… 84
Ⅵ-3. Presep® カラムアダプター …… 86
Ⅶ. カラムクロマトグラフ用担体
Ⅶ-1. 担体一覧 …… 88
Ⅶ-2. シリカゲル …… 89
Ⅶ-3. その他の充てん剤 …… 94
Ⅷ. 薄層クロマトグラフ用製品 …… 97

Ⅲ. 品質保証、カラム管理上の注意点

Ⅲ-1.カラム品質

Wakosil®充てん剤およびWakosil®充てんカラムWakopak®は、高品質なカラムとして安定供給するために当社の厳しい品質管理にもとづいて製造されています。

シリカゲル充てん剤ロット毎の品質検査

充てん剤ロット毎に、粒子形状のチェックや粒子径の測定といった物性検査に加えて、実際に充てんカラムにて、一項目の検査にいく種もの試料を用いた品質検査を行っています(下記に一例を挙げております)。厳しい条件を通過した、選りすぐりの充てん剤を用いておりますので、様々な分析に安心してご使用いただけます。

■エンドキャッピング(塩基性化合物)試験方法の一例

塩基性化合物は、充てん剤中の残存シラノールの影響により、吸着およびテーリングが生じることが知られています。塩基性化合物である、ピリジン・プロカインアミドを用いて、エンドキャッピング効率を検査しています。

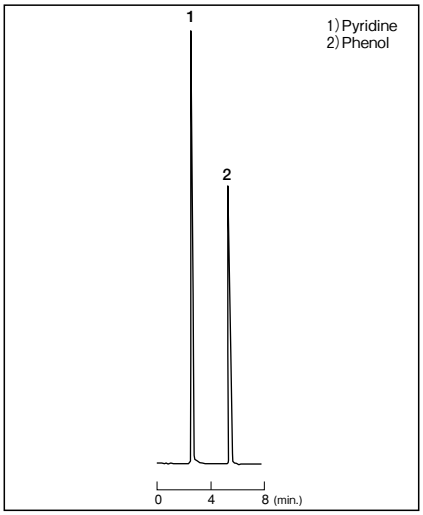
■金属配位性化合物試験法の一例

金属配位性化合物は、充てん剤表面の金属の影響により、吸着テーリングが生じることが知られています。金属配位性化合物であるヒノキチオールを用いて、含有金属の影響を検査しています。

■ロット間差(保持係数・分離係数)試験法の一例

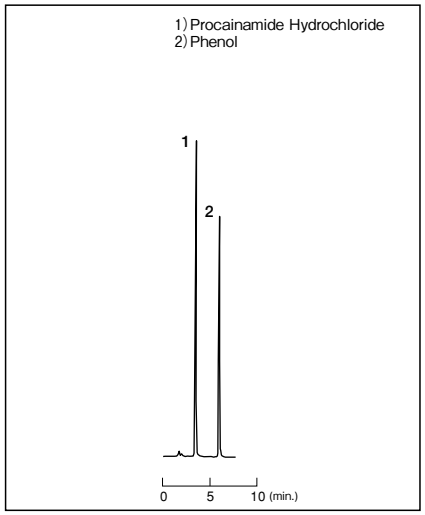
カラムの充てん状態はウラシル・ベンゼン・ナフタレンの検査により管理しています。充てん剤ロット間差、カラム間差の少ない安定したカラムの供給を行っています。

エンドキャッピングテスト1



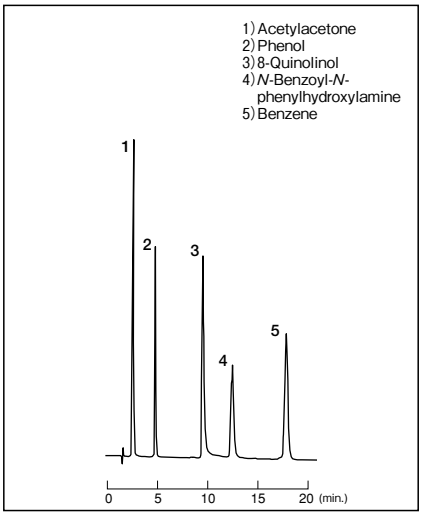
Column : Wakopak® Wakosil-Ⅱ5C18 RS (4.6mm×150mm)
Eluent : CH_3CN/H_2O=30/70(v/v)
Flow Rate : 1.0ml/min. at 35℃
Press : 50kg/cm²
Detection : UV 254nm

エンドキャッピングテスト2



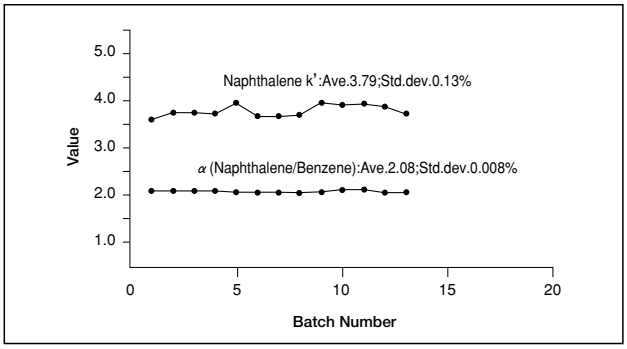
Column : Wakopak® Wakosil-Ⅱ5C18 RS (4.6mm×150mm)
Eluent : CH_3OH/20mM K_2HPO_4 (pH7.6)=40/60(v/v)
Flow Rate : 1.0ml/min. at 30℃
Detection : UV 254nm

含有金属の影響



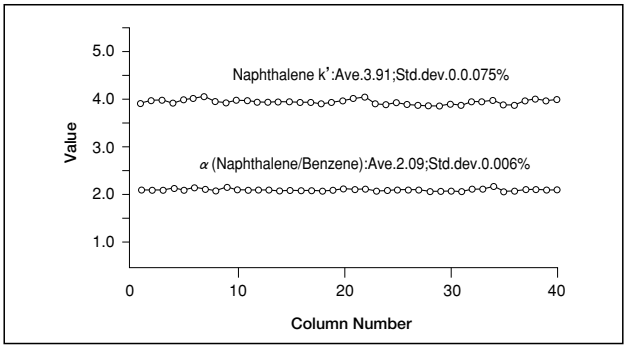
Column : Wakopak® Wakosil-Ⅱ5C18 HG (4.6mm×150mm)
Eluent : CH_3CN/20mM K_2HPO_4 (pH7.6)=40/60(v/v)
Flow Rate : 1.0ml/min. at 30℃
Detection : UV 254nm 0.16AUFS

充てん剤・ロット間差



Column : Wakopak® Wakosil-Ⅱ5C18 HG(4.6mm×150mm)
Eluent : CH_3CN/H_2O=60/40(v/v)
Flow Rate : 1.0ml/min.
Sample : Uracil,Benzene,Naphthalene

カラム間差



Column : Wakopak® Wakosil-Ⅱ5C18 HG(4.6mm×150mm)
Eluent : CH_3CN/H_2O=60/40(v/v)
Flow Rate : 1.0ml/min.
Sample : Uracil,Benzene,Naphthalene

カラムの価格表はp.71に掲載しています。

GMP 分析バリデーションサポート

Wakosil®-Ⅱ 3C18 HG・RS・AR, Wakosil®-Ⅱ 3C8 RS[粒子径3μm]
Wakosil®-Ⅱ 5C18 HG・RS・AR, Wakosil®-Ⅱ 5C8 HG・RS[粒子径5μm]
及びHandy ODSの各種パックドカラムへ充てん剤の性能を保証する証明書を添付しております※1

当社では、従来から添付しているパックドカラム1本毎にそのカラムの充てん状態をテストし品質を保証した"Wakopak® Column Performance Report"に、上記10種の充てん剤については分析バリデーションへの支援として〈1〉シリカゲル基材自身の諸物性〈2〉修飾後の各種充てん剤特性の規格値と実測値を記載し、規格内の再現性を保証した"Wakopak® Certificate of Analysis"を添付※1しております。

このバリデーションをサポートしたカラムは、従来より販売しておりましたカラムに充てん剤の品質を保証する証明書を添付したものです。

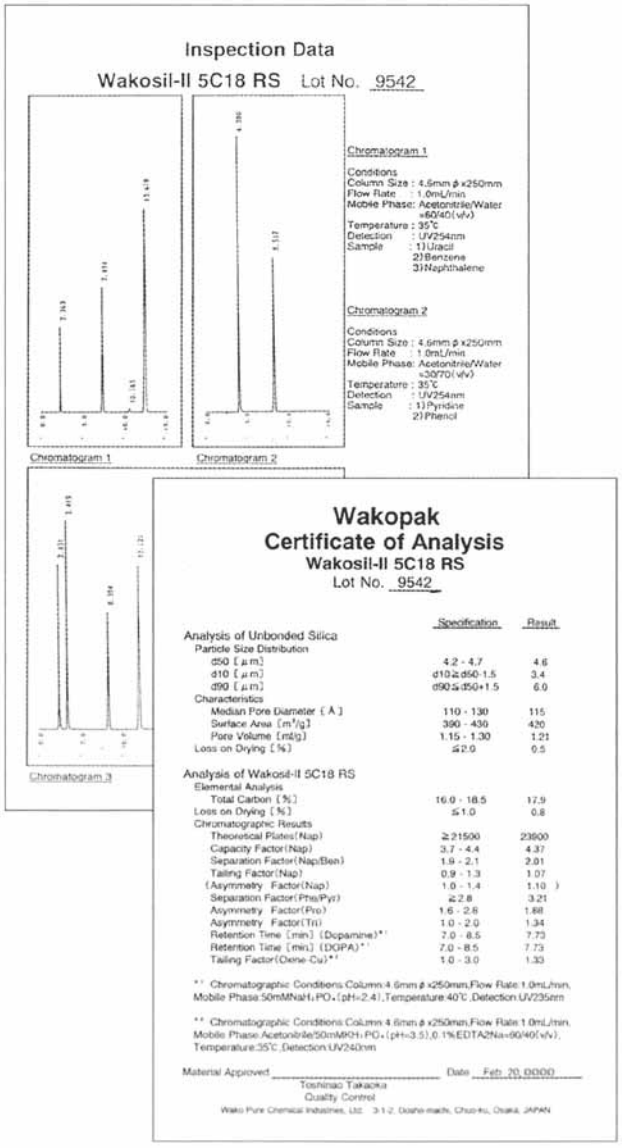
※1：プレカラム・ガードカラムは除く

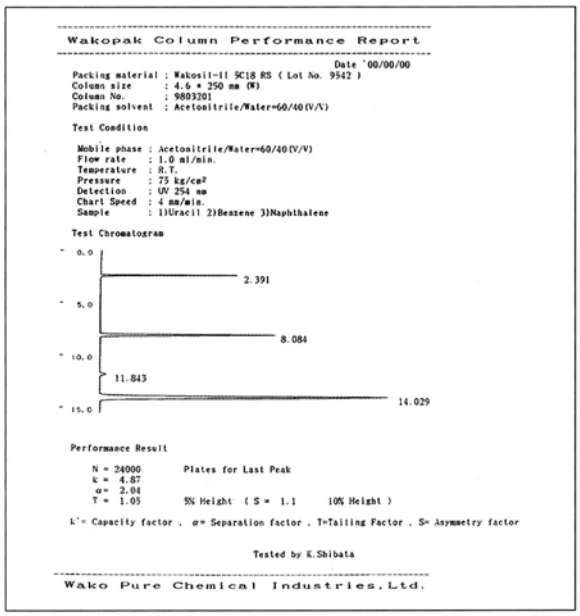
■Wakopak® Column Performance Report

カラムそれぞれの充てん状態を検査し品質を保証

- 理論段数(Naphthalene)
- 保持係数(Naphthalene)
- 分離係数(Naphthalene/Benzene)
- ピーク対称性(Naphthalene)テーリングファクター及びシンメトリーファクター(10%ピーク高さ)

添付成績書、証明書記載内容の一例


Inspection Data
Wakosil-II 5C18 RS Lot No. 9542
Chromatogram 1
Chromatogram 2
Chromatogram 3
Wakopak
Certificate of Analysis
Wakosil-II 5C18 RS
Lot No. 9542


Wakopak Column Performance Report
Test Chromatogram
Performance Result
Wako Pure Chemical Industries,Ltd.

■Wakopak® Certificate of Analysis

充てん剤(原料シリカ・修飾シリカ)をロット毎に各分析条件※2で性能・特性を評価、その実測値と規格値を記載

※2：充てん剤の種類により分析項目は異なります。

原料シリカゲル

- 粒度分布
- 細孔径、比表面積、細孔容量
- 乾燥減量

ODS 修飾シリカゲル

- カーボン含量
- 乾燥減量
- 理論段数(Naphthalene)
- 保持能(Naphthalene)
- 分離係数(Naphthalene/Benzene)
- ピーク対称性(Naphthalene)テーリングファクター及びシンメトリーファクター(10%ピーク高さ)
- 分離系数(Pyridine/Phenol)…塩基性化合物に対する不活性度
- シンメトリーファクター(Procainamide&2,4,6-Trimethylpyridine)…塩基性化合物に対する不活性度
- 保持時間(Dopamine&DOPA)…極性物質の保持特性
- テーリングファクター(Oxine-Cu)…金属配位性化合物に対する不活性度
- 平面認識能(Triphenylene/Dibenz[a,h]anthracene)

カラムの価格表はp.71に掲載しています。

■Wakopak® テストサンプル

モード	充てん剤	サンプル	モード	充てん剤	サンプル
逆相分配	C18、C8、C4、TMS、Ph	ウラシル、ベンゼン、ナフタレン	専用	PTH	PTHアミノ酸(20成分)
順相分配	CN	ウラシル、ベンゼン、ナフタレン		PTC	PTCアミノ酸(17成分)
	NH_2	ベンゼン、チミジン		DNA	オリゴヌクレオチド
親水性相互作用	AS-AQ	トルエン、チミジン		Cu	オキシン銅
イオン交換	SAX	ウリジン、5'-UMP		Agri-9	オキシン銅、MCPP、イプロジオン、TPN
	SCX	ウリジン、シチジン		GP-N6、PAHs、AS-Aqua	ウラシル、ベンゼン、ナフタレン
ゲルろ過	Diol	タンパク質分子量マーカー		DNPH-Ⅱ	DNPHアルデヒド類
吸着	SIL	ベンゼン、ニトロベンゼン		Fluofix、Fluofix-Ⅱ	ウラシル、トルエン、ヘキサフルオロベンゼン

Ⅲ-2.カラム管理上の注意点

カラム使用上の注意 1

1.カラムに衝撃を与えないで下さい。また送液は、ラベルの矢印方向へ行って下さい。
2.カラム内に封入されている溶媒の種類を確認下さい。移動相との混合が可能であるか、また緩衝液等を用いる場合、塩類の折出などの問題が発生しないかどうかを考慮して下さい。
3.移動相は、必ず高速液体クロマトグラフ用を用い脱気操作を行って下さい。特に、逆相系、イオン交換に用いられる有機溶媒と水系の場合、混合初期に気泡がなくても分析過程で発生することがあります。また緩衝液に用いる塩の種類により気泡の発生が多いものもあります。
4.脱気操作は、脱気専用装置がない場合に減圧により行われることがよくありますが、移動相の組成変化に注意して下さい。超音波を併用したヘリウム脱気が効果的です。
5.HPLCにカラムを接続する時は、0.1ml/min.程度の低流量で送液しながらカラムを接続すると、カラム内への気泡の混入を防ぐことができます。プレカラムを使用する場合は、プレカラムを前述のようにHPLCに接続し、次に接続ジョイントを取り付け、液が出るのを確認した上で分析カラムを接続して下さい。
6.高流量でカラムを使用する時は、できる限り1ml/min.程度から送液を行ない順次使用流量まで上昇するようにして下さい。その時に各接続部よりモレが無いことも確認下さい。
7.試料はできるかぎり0.45μm程度のフィルターでろ過して注入して下さい。
(参考)・HPLC用溶媒類(本文180頁)・フィルター(本文28頁)

カラム使用上の注意 2

1.カラム内に封入されている溶媒から、使用する移動相への平衡化に要する液量は、充てん剤・カラムサイズ・検出器・移動相などの種類により異なりますが、おおよその目安としてカラム容量の15～20倍量と考えて下さい。特にイオン対クロマトグラフィーの場合は平衡化に長時間を要することがあります。
2.順相吸着系のシリカゲル充てんカラムは、シリカゲルの含水量や移動相中の水分により分離や溶出時間が多分に左右されます。対応として非極性溶媒の中に0.1～0.2%の極性溶媒を添加したり、あえて水飽和させて使用したりすることがあります。
3.移動相の置換は、カラム内だけでなくHPLC装置内にも十分注意して下さい。前に使用していた移動相の混入により、劣化するカラムもあります。インジェクター(サンプルループ内)、ダンパー、ミキサーなどに特に注意が必要です。

カラム使用上の注意 3

1.カラムの取りはずしは、HPLCの圧力計が必ずゼロになっていることを確認してから行って下さい。
2.移動相のpHは2.5~7までがカラムライフ上、最適です。(Wakosil® ARタイプはpH2～8)
3.使用圧力および流量は、充てん剤の種類や粒子径、カラムサイズ、移動相の粘度により異なりますが、分離能・分析時間を考慮するとともに、なるべく低い圧力での使用がカラムライフに有利です(カラム取扱説明書参照)。
4.10℃～50℃の範囲内でご使用ください。
5.カラムを加温(室温より高く)した場合、測定終了後はすぐに送液を止めないでカラム温度が室温になってから送液を停止してください。

カラム使用上の注意 4

1. カラム使用後は、試料を良く溶出できカラムに影響のない溶媒などで洗浄し保管して下さい。保存溶媒はカラム購入時に封入されていた溶媒等が最適です。また緩衝液を使用した場合は、蒸留水を流し塩類をカラム内から取りのぞいて下さい。
2. イオン対クロマトグラフィーを行った場合は、水洗後、メタノール/水=50/50(v/v)で洗浄することにより、カラム内のイオン対試薬を効率よく洗浄することができます。
3. 保存溶媒は、塩素系を使用しないで下さい。
4. 必ず密栓をして、カラム内を絶対乾燥させないで下さい。
5. 万一乾燥させてしまった時は、保存封入していた溶媒をHPLCで0.1～0.2ml/min.の低流量で送液し、カラムの出口より液が出るのを確認した後、送液を一時中止して下さい。約5～10分放置後、通常どおり送液して下さい。当初の性能より低下していますが、再度ご使用になれる場合があります。
6. 長期間保存する場合でも、1～2ヶ月に一度カラム内を通液して下さい。
7. カラムの保守のために、頻繁に洗浄したり洗浄液量を多くすることは、できる限り避けて下さい。カラムは送液するだけでもライフが短くなります。溶媒の種類を頻繁に変えることも同様な結果になります。

カラムの洗浄方法と保存溶媒

カラムの種類や移動相、試料により、カラムの洗浄方法は異なります。一般的な方法は次の操作により行います。
保存溶媒は、カラムをご購入された時に封入されている液で保存するのが一般的です。

逆相系シリカゲル

1. 充てん剤の汚れは、THFをはじめクロロホルム、ジクロロメタンなどの中極性溶媒を流すことにより除去できますが、これら塩素系溶媒を含む状態でカラムを保存しないでください。
2. カラムを長期保存する場合はメタノールまたはアセトニトリルで置換してください。
3. 移動相として無機塩バッファーを使用した後は、まず水でカラム内を洗浄しさらに0.1%りん酸水溶液(カラム体積程度)で順次カラム内を置換してからアセトニトリル、メタノールなどで保存してください。

水→メタノール→クロロホルム→メタノール
↑
DMSO(200μl)数回注入
(各洗浄液は、カラム容量の10倍程度)

順相系シリカゲル

1. シリカゲルの劣化は主として極性物質の吸着により起こります。また、水分等により吸着能が低下した場合、再生は次のような手順で行うことができます。化学結合型カラムは順相系での使用か逆相系での使用かにより洗浄方法は異なりますが、右記の方法が一般的です。但し、使用移動相から洗浄液への置換時は、相互の混和性に注意してください。
2. カラムを長期保存する場合は、下記の溶媒で保存してください。
   ●シリカゲルカラム：*n*-ヘキサン
   ●化学結合型カラム：エタノール

●シリカゲルカラム
IPA→クロロホルム※→クロロホルム→n-ヘキサン
※(2% 2,2-ジメトキシプロパン / 1% 無水酢酸)

●化学結合型カラム(順相系使用)
メタノール→クロロホルム→*n*-ヘキサン

●化学結合型カラム(逆相系使用)
水→メタノール→クロロホルム→メタノール
(各洗浄液は、カラム容量の10倍程度)

イオン交換系シリカゲル

1. カラムの劣化は主としてイオン性物質(金属イオン、ハロゲン化物イオンなど)の吸着により起こります。再生は右記の手順で行うことができます。
2. カラムを長期保存する場合は無機塩などを水でよく洗浄した後、メタノールあるいはアセトニトリル100%で置換ください。

水 → 0.1M EDTA・2Na → 水 → メタノール→水

カラム圧力上昇

カラムを使用いただいているとカラム圧力が異常に上昇することがあります。カラムが目詰まりしていることが原因として考えられます。

溶出力が強い溶媒を通液することで詰まりが解決することがあります。それで解決しない場合、カラムを逆に接続し通液することで戻ることがあります。しかし、カラム性能が低下する可能性もありますので最後の手段とお考えください。